



TITLE:

向神経性発癌物質Methyl-nitroso-  
urea, Ethyl-nitroso-ureaのSD-JCL  
rat の脳に対する催奇形効果

AUTHOR(S):

小山, 素麿

---

CITATION:

小山, 素麿. 向神経性発癌物質Methyl-nitroso-urea, Ethyl-nitroso-ureaのSD-JCL rat の脳に  
対する催奇形効果. 日本外科宝函 1970, 39(4): 233-254

ISSUE DATE:

1970-10-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/207889>

RIGHT:

向神経性発癌物質 Methyl-nitroso-urea,  
Ethyl-nitroso-urea の SD-JCL rat の  
脳に対する催奇形効果

京都大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 半田 肇教授)

小 山 素 磨

〔原稿受付: 昭和45年9月2日〕

Erzeugung von Missbildungen im Gehirn durch  
Methyl-nitroso-harnstoff und Äthyl-nitroso-  
harnstoff an SD-JCL Ratten

TSUNEMARO KOYAMA

Neurochirurgische Universitätsklinik Kyoto  
(Direktor : Prof. Dr. HAJIME HANDA)

In vorangegangenen Versuch mit Methyl-nitroso-harnstoff (MNH) war erstmalig von Druckrey und seine Mitarbeitern die selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark bei chronischer intravenöser Injektion an BD-Ratten gelungen. Bisher war die Erzeugung von Hirntumoren nur durch eine lokale Implantation von carcinogenen Kohlenwasserstoffen in das Gehirn an Ratten möglich gewesen.

Auf der anderen Seite wurde von Kreybig die teratogene Wirkung des MNH an Ratten untersucht. Eine einmalige Gabe von MNH, an trächtige Ratten am 13. oder 14. Tage der Schwangerschaft injiziert, führte bei praktisch allen Nachkommen zu schweren Mißbildungen im Gehirn, am Gesicht, an Extremitäten und so weiter.

Später wurde es bewiesen, daß eine einmalige Gabe von Äthyl-nitroso-harnstoff (ÄNH) an schwangeren Ratten am 15. Tage post coitum bei den Nachkommen zu Mißbildungen an den Pfoten (Ektro, Syn, bzw. Oligodaktylie) führte, und daß sie im jugendlichen Alter von 160-221 Tagen an den Tumoren im Gehirn, im Rückenmark und peripherem Nervensystem gestorben waren.

Deshalb sind die Wechselbeziehungen der teratogenen und neurogenen carcinogenen Wirkung von MNH und ÄNH zum Problem geworden.

Die embryo-toxischen und teratogenen Effekte bei SD-JCL Ratten nach einmaliger Applikation von MNH oder ÄNH an verschiedenen Tagen der Gestation wurden untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse unserer Experimente sind folgende:

(1) Eine Gabe von 10mg/kg MNH an trächtig SD-JCL Ratten, am 9.0. Tage der Schwangerschaft intraperitoneal injiziert, führte bei 62.5% Nachkommen zu Exencephalie oder Encephalocele, und die einmalige Gabe am 9.5. führte bei 85.0%,

\* 本研究費の一部は昭和44, 45年度厚生省がん研究費によつた。

\*\* 本研究の一部は、第9, 10回日本先天異常学会、第11回日本神経学会総会で発表した。

am 11,5. Tage zu bei 29.3% der Nachkommen zu Hydrocephalie. Nach dem 12,5. Tage führte sie bei allen Nachkommen zu Mikrohydrocephalie oder Mikrocephalie. Selbst nach der Applikation von 10 mg/kg MNH am 15,5. Tage nach dem Koitus wurde noch die Mikrocephalie bei allen Fällen beobachtet.

(2) Bei der Mehrzahl der Kinder, deren Mütter 50 mg/kg MNH am 20,5. Tage der Schwangerschaft injiziert worden waren, ergaben sich Ataxie und allgemeiner feiner Tremor. Nach dem Aussehen hatten die Kinder-ratten keine Mißbildung, trotzdem aber wurde das hypo-dysplastische Kleinhirn beobachtet.

(3) Eine einmalige intraperitoneale Applikation von ÄNH an schwangeren Ratten vom 8,5. bis 10,5. Tage der Gestation führte zu Exencephalie, Encephalocele, Hydrocephalie und so weiter, in gleicher Weise wie bei der Gabe von MNH. Nach dem 11,5. Tage bleibt sie dagegen vollkommen aus. Dies deutet darauf hin, daß die teratogene Wirkung des ÄNH sich nach der Placentation vielleicht von der Wirkung des MNH unterscheidet. Es war eine Ausnahme, daß bei 82.6% Nachkommen, deren Mütter am 13,5. Tage der Schwangerschaft 50 mg/kg ÄNH injiziert worden waren, Syn-, Oligodaktylie nachgewiesen wurden.

(4) Wenn die schwangeren Ratten am 9,5. Tage post coitum eine einmalige intraperitoneale Injektion von 25 mg/kg ÄNH erhielten, konnte man bei 78.0% der Nachkommen die Hydrocephalie beobachten. Dies ist vielleicht eine der besten Methoden für die Erforschung der Ursache der Hydrocephalie.

(5) Wegen der schweren Mißbildung konnten beinahe alle der Neugeborenen, deren Mütter das MNH injiziert worden war, nicht aufgezogen werden. Während doch Jungtiere, deren Mütter das ÄNH injiziert worden war, in den meisten Fällen leicht aufgezogen werden konnten.

## I 緒 言

哺乳動物における催奇形実験は1948年 Gillman et al.<sup>25)</sup> が trypan blue を rat にあてた実験に始まるが、最近では催奇形効果と発癌作用を同時にもつ種々の化学物質が発見され、これら両作用の相関関係が検討されている<sup>7)</sup>。Methyl-nitroso-urea (MNU) で rat の中枢神経系に選択的に悪性腫瘍を発生させた Druckrey ら<sup>12)</sup> の報告はこれまで実験動物の脳内に直接発癌性炭水化物を接種しないかぎり作り得なかった実験脳腫瘍を<sup>22 29 34 58 70)</sup> 静脈内注射で高率に発生させた点で、脳腫瘍の原因追求に一つの新しい分野を開いた。

一方、MNU は胎生13日および14日に作用させると脳、顔面、四肢骨などに極めて強い奇形を発生させ、終脳に対しては一次的な发育障害作用を示すことが明らかにされている<sup>41)</sup>。

その後 Ethyl-nitroso-urea (ENU) を妊娠15日目の BD 系 rat に一回静脈内注射をすると指趾の奇形を

もつ offspring が得られ、これを長期飼育すると脳、脊髄、脳神経などに高率に glioma が発生して来ることが報告されるに至り発癌性化学物質の胎盤通過性も問題となつてきた<sup>14, 33)</sup>。

そこでわれわれは MNU, ENU を種々の妊娠日令の母 rat に投与し、その offspring にみられる催奇形作用と発癌作用の各投与時期における相関を検討して来た。

MNU は胎児の脳の发育に極めて特異な stage specific な効果を示し、投与時期をかえることにより水頭症、外脳症、小水頭症をかなりの精度で作りわたることが出来るが<sup>38)</sup>、さらにその发育障害作用により一般の催奇形物質で認められる critical period をはるかにすぎた妊娠末期に与えても小脳性と考えられる失調 rat や小頭症 rat を作成しこれを長期間飼育することに成功した。

また、ENU についても MNU の場合と同様 SD-JCL rat を用いて催奇形作用を検討したところ両者は多少異なった作用をもつことが明らかになった。

そこで、ここでは下記の3つの実験をもとにして MNU と ENU の催奇形効果を比較検討してみた。

実験1：MNU の SD-JCL rat 胎児の脳に対する催奇形効果。

実験2：MNU により誘発され、小脳性と考えられる失調症。

実験3：ENU の SD-JCL rat 胎児の脳に対する催奇形効果とその後の発育に及ぼす影響。

## Ⅱ 実験材料および方法

実験動物には SD-JCL rat (日本 CLEA) を用いた。生後約30日令で購入し温度20~24℃、人工照明で明時間、暗時間をほぼ等しくした実験動物飼育室で固型飼料 (日本 CLEA, CA-1) および水を自由に摂らせた。生後60日令より100日令の雌で外陰部の観察により発情期にあると判定したものを健康な同系の雄と同居させ、暗時間を6時間経過させたのち交配栓の認められたものを妊娠0日0時として分離飼育した。

### 1) 実験1：MNU の SD-JCL rat 胎児の脳に対する催奇形効果

25群よりなり1群には最低5匹の母 rat を使用した。うち23群に対しては MNU を0.1%水溶液として10mg/kg, 20mg/kg および 40mg/kg の割合で妊娠8.5, 9.5, 10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 14.5, および 15.5日令のいずれかに一回腹腔内注射を行なった。なお8.5日, 40mg/kg 投与群は8.5日, 20mg/kg ですでに全胎児の死亡が確認されたので施行していない。又水頭症などの脳の奇形が9.5日10mg/kg 群で多発したので, 9.0日, 10mg/kg 群と10.0日, 10mg/kg 群を追加した。

これらの母 rat は全例妊娠20.5日に ether 麻醉下で開腹し、子宮の着床痕を観察したのち胎児をとり出した。したがって総胎児数にはこの着床痕のみの数も含まれている。胎児は外表の奇形をこまかく観察したのち Bouin 液で約7日間固定した。

脳は freehand razor blade section<sup>67)</sup> 又は双頭実体顕微鏡下で観察を行なった。10mg/kg 投与のものはそれぞれ各群から代表的な形のを数例づつ選び10μの連続切片とし30μごとに H. E. 染色をほどこした。残りの標本は無染のまま保存した。この実験で観察した生存胎児数は1,023個である。

生後観察は各日とも 10 mg/kg とし、1群に2~3匹の母 rat を使用した。母 rat は注射後分娩用ケージに移し、自然分娩を行なわせた。しかし、死産または

suffocation のため実際に飼育出来たものは10.5日, 15.5日投与のものだけであつた。これらは同一飼育室内で生後400日令まで飼料、水を自由に摂らせた。

### 2) 実験2：MNU により誘発された小脳性と考えられる失調症

いわゆる奇形に対する critical period に MNU を投与した場合、あまりにも強い催奇形作用のために生後観察にたえる offspring を得ることは困難であつた。

そこで一般に催奇形作用はないと考えられている妊娠末期を選んで比較的大量の MNU の投与を計画した。

発育のよい約100日令の処女 rat を健康な雄と交配させ妊娠を触診で確認出来たものを6匹選び、妊娠20.5日目に MNU を 50mg/kg 腹腔内に1回のみ0.5%の水溶液としてすみやかに投与した。

分娩日の判定は母 rat を刺激して suffocation するのをさけるため新生児のなき声のみで行ない生後7日目にいたつてはじめて乳児数を数えた。7日目と21日目に乳児の中より、それぞれ6匹、5匹を無作為にとり出し、Bouin 液で約1週間固定したのち実体顕微鏡下で脳をとり出した。残りは同じ飼育室内で固形飼料と水とを自由に摂らせ125日令まで飼育した。このうち10匹は発癌作用を検討するためにさらに長期間飼育することにし、残りのものは歩行や振戦の状態を観察してのち ether 麻醉下で屠殺し、開頭して脳をとり出した。脳は Bouin 液または10% formalin 液で固定したのち実体顕微鏡下で解剖した。一部は10μの連続切片とし2枚ごとに H. E. に染色を行なった。

### 3) 実験3：ENU の SD-JCL rat の胎児の脳に対する催奇形効果とその後の発育に及ぼす影響

使用した動物、飼育条件、妊娠日の判定、胎児の観察方法は実験1と同様である。ENU の投与量は50mg/kg とし、投与日は8.5, 9.5, 10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 14.5, および15.5日のいずれかで0.5%水溶液 (pH 6.5) として1回のみ腹腔内に注射した。又9.5日を中心として頭の奇形が出ることがわかつたので、0.25%水溶液として25mg/kg 投与を8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0日に追加した。したがって実験群は13となり、各群とも5匹以上の母 rat を使用した。観察した生存胎児総数は702である。

## Ⅲ 実験結果

### 1) MNU の胎児致死作用

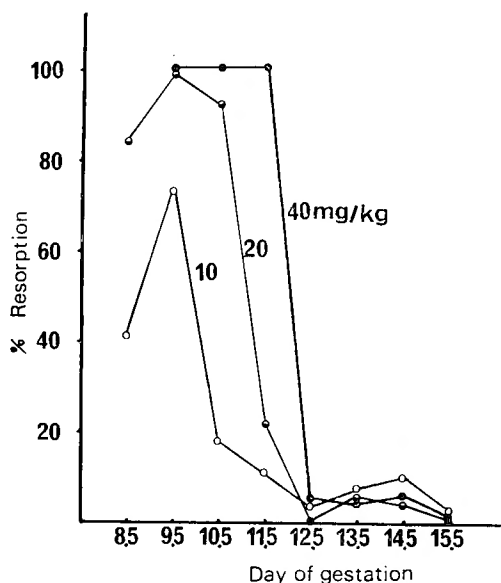


Fig. 1. Lethal effects of various doses of MNU in rat embryos

MNU の胎児に対する致死効果は Fig. 1 に総括したように投与日と投与量の間きれいな相関がみられた。40mg/kg を妊娠 11.5日またはそれ以前に投与すると胎児は全例吸収されるか死亡していた。妊娠 12.5日またはそれ以後に投与したものでは致死作用は数パーセント内外であり、投与量、投与日による差はいずれも有意とはならなかった。

投与量を 20mg/kg に減じて妊娠 9.5 日投与群ではその致死作用は100%に達し、10.5日またはそれ以前の投与でも依然として極めて高い死亡率を示し、MNU の催奇効果をみるのには不適当と考えられた。

10mg/kg 投与群での胎児死亡率は8.5日、41.2%、9.5日、72.2%、10.5日、18.5%であり、9.5日にその peak を示し以後急激に減少した。

したがって、SD-JCL ratに対するMNUのcritical dose は 10mg/kg またはそれ以下であると判定した。

## 2) MNU の催奇形作用

それぞれの投与日、投与量に対する外表奇形の出現率は Fig. 2 に示した。ただし単なる水頭症は外表奇形に含めていない。Wilson<sup>67)</sup> は "dome shaped head" により外表からも水頭症がわかるのとべているが、本実験の場合明かに dome 形の頭にみえても剖検により水頭症と判定出来ないものがあり、又その逆の

場合にも屢々遭遇した。

全体として12.5日が MNU に対し最も感受性が高い時期であり 10mg/kg 投与群においてさえ生存胎児の100%に奇形を認めた (Fig. 2)。11.5日投与において

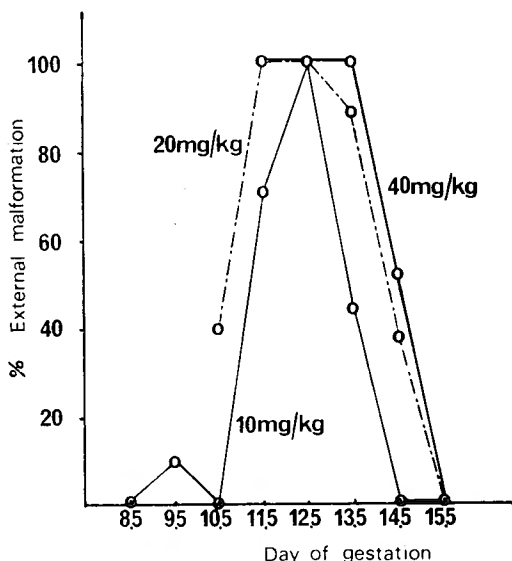


Fig. 2. Percentage of malformed rat embryos treated with various doses of MNU.

は 10mg/kg で 70.7%、20mg/kg では 100%に奇形が出現し、13.5日投与では 10mg/kg で 47.1%に、20mg/kg 投与では90%に認められた。40mg/kg まで増量した場合には 11.5日より 13.5日投与では全例に何らかの外表面奇形がみられた。

これら妊娠 11.5日以降の投与群では Fig. 3 にみられるようにその外表奇形は stage specific な形態をしめした。

11.5日投与群の特徴は、肩関節の背側への偏位、上肢の外反がみられることで、他の日の投与群には決してみられないものであつた。足趾があたかも上肢の指のような形となることも、もう一つの特記すべき所見である。頭部に比べ軀幹の発育が悪いために本当は小さい頭を小さく感じられなかった。

12.5日投与群は、この実験における最も強い外表奇形をしめし、明らかな小頭症、小下顎症、欠指又は癒合指(趾)のほか著明な発育阻害作用がみられた。

13.5日投与群では全体としての proportion は保たれているが、四肢の遠位部が極端に小さく、指趾の発育が特に強く障害されていた。

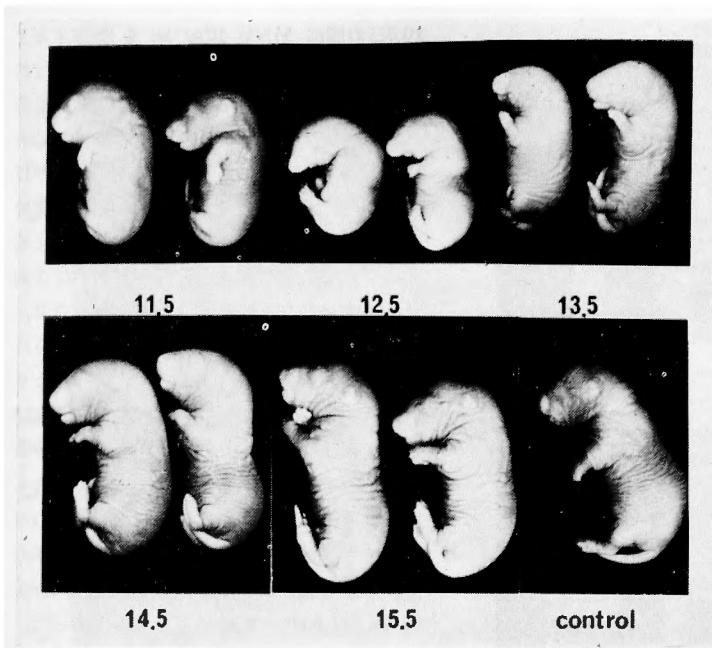


Fig. 3. External malformations in rat embryos treated with 10 mg/kg of MNU on day given below each picture.

14.5日投与群になると MNU による外表奇形は下肢の趾の欠指または癒合趾のみとなり、15.5日では 40mg/kg 投与群でさえ明らかな奇形は認められなかった。

このように胎盤形成期（胎生11日ごろ）以後の外表奇形にはそれぞれの投与日に対応する特徴が認められたが、脳においても全くこれに一致する平行関係がみられた。

Fig. 4 および 5 に示すように11.5日投与群では対照と比べやや小さいこと以外、脳の外觀にはいじりしい差異は認められなかったが、脳室系の異常がみられるものがあつた。しかし12.5日以後の投与群では、12.5日投与を最強として以後連続的に減少する終脳の発育阻害作用が認められた。すなわち 12.5日投与群では嗅脳、前頭極では比較的良好に発達し細胞構築も6層から成っていたが、所々に rosette の遺残をみとめた。吻側に進むにつれ外套は薄くなり、著しく拡大した Monroe 孔の部分では2～3層の外套となり rosette の数も増加した。choroid plexus は hypoplastic であり、脳梁はほとんど形成されておらず、大脳鎌はみられなかった、第3脳室は極めて大きく、原始的な間脳のままの状態にあり視床下部に比し視床は薄く rosette がみられ diencephalic roof plate は脳表までのび、その両側に著しく小さい大脳

半球がみられた。これに対し四丘体、橋、小脳、延髄などは比較的よくその形態を保っていた。

13.5日投与になると、嗅脳、前頭部は12.5日群に比べるとかなりよく形成されているが細胞構築はばらばらで、ことに脳室外側に多くの rosette が残っていた。Monro 孔の部位では側脳室、第3脳室ともに choroid plexus の過剰増生がみられ、脳室内はこれでうめられたような様相を呈した。さらに choroid plexus の充満した第3脳室の一部は脳梁、大脳鎌等の欠損により離開した大脳半球間に脱出し上矢状洞に達していた。間脳の roof plate には上衣細胞の過剰増殖がみられ背側に噴出していた。この時期の1つの特徴は四丘体の形態に変化がみられることで、下丘の発育が悪

く全体を背面から見ると「W型」にみえた。

14.5日投与群では終脳の発育阻害作用はやや軽度となり、前頭部ではわずかに脳梁の形成はみられるが、大脳鎌はまだ形成されておらず上矢状洞周辺に輪状の硬膜の増生がみられた。Monro 孔、第3脳室部より吻側には脳梁はみられず、choroid plexus の充満した第3脳室が大脳半球間に突出しているのは13.5日投与群と同様であった。四丘体はいくぶん角ばった形となり正常にみられるなどらかな丸味はみられなかった。

15.5日投与群では終脳以外は対照と差がみられなくなる。外套の細胞構築は6層を区別し得ないが rosette 遺残は少なくなっていた。脳梁はやはり短く、第3脳室の天井は後方、松果体窩に膨出していた。

このように median cerebral structure の形成不全を伴う終脳の発育障害が MNU による脳の奇形の中心という。

これらの胎盤形成期以後に MNU の投与を受けた奇形児を生後観察することは非常に困難であり、死産又は suffocation を受けずに飼育出来たものは15.5日投与群のみであった。これらは外觀からも小頭症であることがわかり、尾をもつてつり下げたとき下肢は鉗状脚となつた (Fig. 6, C)。また15例中3例以上に生

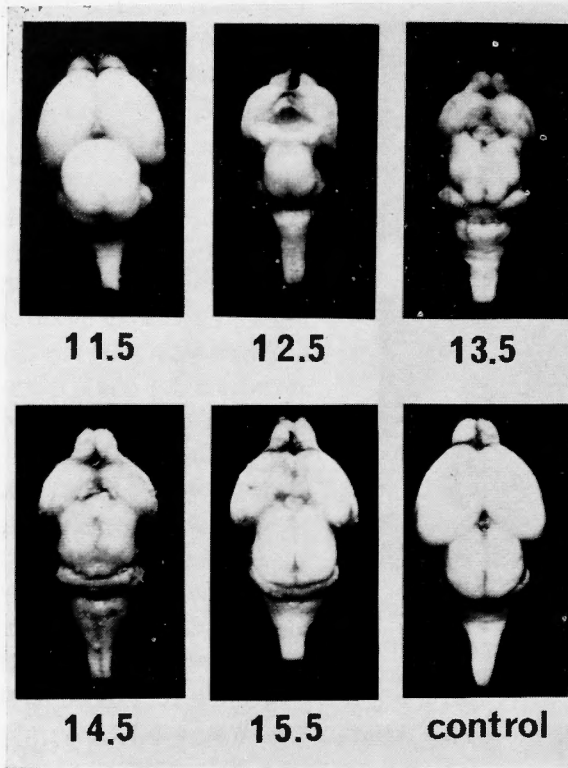


Fig. 4. CNS malformations in the rat embryos treated with 10mg/kg of MNU on day given below each picture.

後100日令ごろから始り1日に1～数回出現する全身性痙攣を認めた。

これに反し胎盤形成期以前の投与(妊娠8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5日)群では小数の例外を除き軀幹や四肢の奇形は認めなかつた。MNU 20mg/kg, 10.5日投与群で5匹の生存児を得たが、この内2匹に癒合指、欠指および尾の欠損をみたのみであつた。これらの時期に20mg/kgを投与すると一般に着床痕のみがみられるか、または外表奇形がみられないものとなつた。9.5日投与では全例が死亡し、8.5日投与では11匹の生存胎児を得たが、これらは全て奇形をもつていなかった。

投与量を10mg/kgに減じると生存胎児の数は著しく増加する(Fig. 1)。8.5と10.5日投与で得た生存胎児の総数は93であるが、外表奇形を示したものは1例もなく、剖検で外套の形成不全を8.5日投与群に1例、側脳室のみの拡大を10.5日投与群の2例に認めたのみであつた。

Table 1, Fig. 6-A, B, および7に示すように9.0～

10.0日の間に MNU 10mg/kg を投与すると頭部の奇形は多くなつた。9.0日投与群では外脳症または脳髄膜瘤が生存胎児16例中10例(62.5%)にみられ、2例に側脳室の拡大を認めた。9.5日投与群では、これとは逆に20例中17例(85.0%)が水頭症であり2例が脳髄膜瘤であつた。10.0日投与では生存胎児数は急に増え、逆に側脳室の拡大がみられたものは7例(10.3%)となりその程度も一般に軽くなり。さらに10.5日投与では2例(3.8%)に認められたのみであつた。ところが、先に述べたように、11.5日投与でも生存胎児75例中22例(29.3%)に水頭症がみられ、9.5日投与について第2の peak を示した(Fig. 7, 8-C)。これらのうち6例には、側脳室のみでなく第3脳室の拡大もあり、外套はさらに薄く、大脳半球の離開がみられ、いわゆる microhydrocephalus (村上)<sup>49)</sup>の範疇に入るものであつた。中脳水道は、9.5日投与のものでは、種々の程度の狭窄または閉鎖がみられ、11.5日投与のものでは第3脳室の拡大がみられた例でも中脳水道は狭窄のみであつた(Fig. 8)。10.5日投与群で2匹の水頭症の生後観察に成功した(Fig. 6-A, B)。

### 3) ataxia を示す rat の生後観察

生後7日目、21日目、4週令、および8週令に於ける新生児数とその間の自然死亡児数を Table 2 に示した。7日目の新生児数は平均  $8.5 \pm 2.2$  であり対照群の  $12.0 \pm 1.4$  との間には有意の差 ( $p < 0.05$ ) がみられた。標準偏差の大きいことは litter size が最高12匹より最低6匹までとばらつきの大きいことを示している。

このとき総数51匹より無差別に6匹とり出し残り45匹は引きつづき哺乳させたが、生後21日令までに11匹が死亡し、34匹となつた。さらに5匹を選び出し4週令まで哺乳を延長したが、4匹の自然死亡がみられた。8週令までには死亡はなかったが、16週令までに発育の悪かった2匹が自然死または食殺された。結局125日令まで生き残つたのは23匹であつた。

ここで10匹は発癌作用をみるために残し、この研究のために13匹を殺した。この間対照群には自然死を全く認めなかつた。

ataxia は3週令で明かとなりほとんど全例にみられ、生長するにつれある程度の個体差がみられた。一

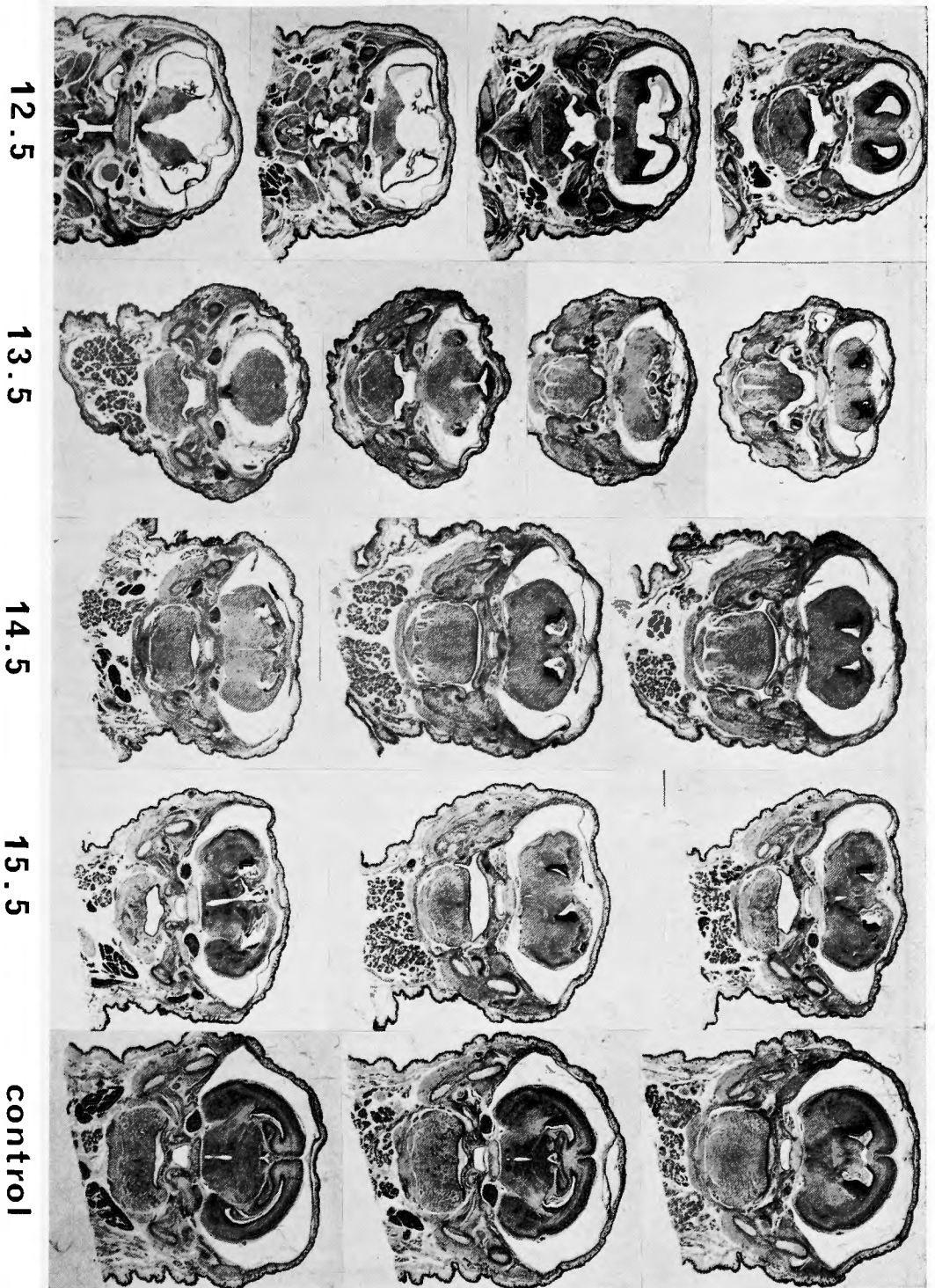


Fig. 5. Microphotographs of the malformed brain of the rat embryos treated with 10mg/kg of MNU on day given below each picture.



Table 1

Day of Treatment	Number of Rats	Total Implantations	Resorptions	Survivors		Exencephalus, Encephalocele	CNS Malformations			Normal
				Externally Normal	Externally Abnormal		Hydrocephalus	Microcephalus	Others	
8.5	5	68	28	40	0	0	0	0	1	39
9.0	5	59	43	6	10	10(62.5%)	2(12.5%)	0	3	1
9.5	5	72	52	18	2	2(10.0%)	17(85.0%)	0	1	0
10.0	6	70	12	58	0	0	7(10.3%)	0	0	51
10.5	5	65	12	53	0	0	2(3.8%)	0	0	51
11.5	6	85	10	22	53	0	22(29.3%)	0	0	53
12.5	5	81	3	0	78	0	0	78(100.0%)	0	0
13.5	5	74	6	36	32	0	0	68(100.0%)	0	0
14.5	5	64	7	57	0	0	0	57(100.0%)	0	0
15.5	5	66	2	64	0	0	0	64(100.0%)	0	0

Toxic and teratogenic effects of 10mg/kg of MNU on SD-JCL rat embryos

般に下肢の方が強かった。125日令での性、体重、症状の程度を Table 3 に示す。4匹はごく軽度の ataxia と注意してみないとわからない程度の振戦をしめしたが尾をもって宙づりにすると振戦の増強を認めた。しかし検者の手をふり切って逃げることや、走することは全く出来なかった。8匹は安静時振戦が明瞭に認められ、歩行は大きく左右に軀幹を振り、時には側腹部が地面につくほどバランスを失った。1匹はあまりにも強い ataxia のために直進すら出来ず、床をころがっていた。体重のばらつきも大きく雄、平均 194±41g 雌、平均 125 : 90g で対照群の雄 320±44g、雌 247±29g にはるかにおよばないものが多かった。

4) ataxic rat の剖検所見

実体顕微鏡下での所見は Fig. 9 に示す。まず第1に注目されることは小脳が異常に小さいことである。生後7日目の標本では posterolateral fissure が明瞭でなく flocculonodular lobe と corpus cerebelli との境界および flocculus と paraflocculus の区別が明かに出来なかったが、paraflocculus という突起部は存在していた。しかし cerebellar hemisphere ではこれを平行にはしる fissure のうち posterior superior fissure, fissura prima, fissura secunda と思われる3つの fissure のみが認められるが対照にみられるようなより多くの fissure 又は sulcus は認められなかった。なかでも特異な所見は vermician lobes の未分化であった。生後21日目の小脳は対照ではほとんど完成した形態をしめしたが、MNU 処置を受けたものでは全く異なった发育を示していた。即ち corpus cerebelli は全体として下に凹の弓形をしめし vermician portion と hemisphere の区別は不明瞭で、横方向に走る fissure は多数の脳溝様の溝におきかえられ大小さまざまな脳回をみるようであった。わずかに uvula と思われる部分が小さく残っていた。又 paraflocculus にも凸凹がみられたが、その大きさは比較的よく保たれていた。125日令の小脳はさらにこれが完成したものとなっていたが、全体としてみた場合、あたかも Larsell<sup>43)</sup>のいう胎生21日目ごろの小脳がそのまま異常な発達をとげたものと考えられた。

5) ENU の胎児致死作用

ENU, 50mg/kg を種々の妊娠日令に単一腹腔内注射をした場合の胎児致死効果は Table 4, Fig. 10 にしめた。致死効果が最も強く現れたのは8.5日投与のときで計 65個 (99.9%) の着床痕又は死亡胚を認め、

Table 2

MNU 50mg/kg, on day 20.5

Mother rat No.	No. of Newborn Rats				
	at day 7	day 21	week 4	week 8	day 125
1	6				
2	8				
3	11				
4	6	51	34	25	25
5	8	6 ; killed 1 ; died	5 ; killed 4 ; died		2 ; died
6	11				
					23
					10→ 13
					used for this study

Control

Mother Rat No.	No. of Newborn Rats				
	at day 7	day 21	week 4	week 8	day 125
1	13				
2	13				
3	11				
4	10	72	66	60	60
5	11	6 ; killed	6 ; killed		
6	14				
					60

Early death of the offsprings treated with 50mg/kg of MNU on 20.5 day of gestation. See text.

生存していた1例は高度な水頭症 (Fig. 8-A) であった。9.5日投与群では34.6%で MNU 10mg/kg 投与の場合より低値であり、以後妊娠日令の増加とともに指数曲線的に減少した。妊娠8.0日より10.0日の間に半量25mg/kg を投与した時の致死効果は Fig. 10 に破線で示したように8.5日投与で19.0%に減少した。

#### 6) ENU の催奇形作用

50mg/kg を妊娠8.5日より15.5日の間に一回腹腔内注射を行なった場合にみられた奇形の数値は Table 4 に、外表奇形の関係は Fig. 11 にしめた。この場合も単なる水頭症は MNU の場合と同様の理由から外表奇形には入っていない。

外表奇形で注目されるのは9.5日と13.5日投与群であった。前者では、外脳症、脳髄膜瘤と、兔唇、小下顎症、無耳症などの顔面奇形が集中して現れた。また前額部がきわだって高くもり上り、脳切によって側脳室

の frontal tip が極度に大きく嗅脳の上におおいかぶさったようになっているので外観からは水頭症というより frontal encephalocele に似ている特殊な水頭症 (Fig. 8-A) がみられた。この type の水頭症は全例、外表所見と剖検所見が一致したので、“frontal type hydrocephalus” として外表奇形の数に入れ common type (Fig. 8-B) とは区別した。

後者では欠指、癒合指となるもので、これらは下肢にみられる場合が多く、少なくとも1指趾に認められたものは57例中47例 (82.6%) に達した (Fig. 12)。

脳に対する ENU の催奇形効果をさらにくわしく知る目的で行なった ENU 25mg/kg 投与群では水頭症は8.5日より10.0日投与で認められたのに対し、脳髄膜瘤、外脳症は9.0～9.5日投与にかぎられていた (Table 5, Fig. 13)。

妊娠11.5日以後に ENU 50mg/kg の投与を行なった

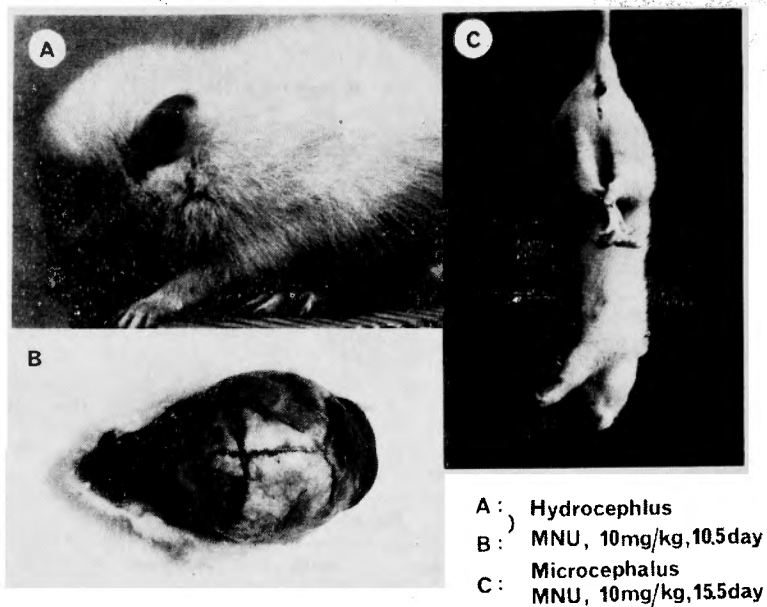
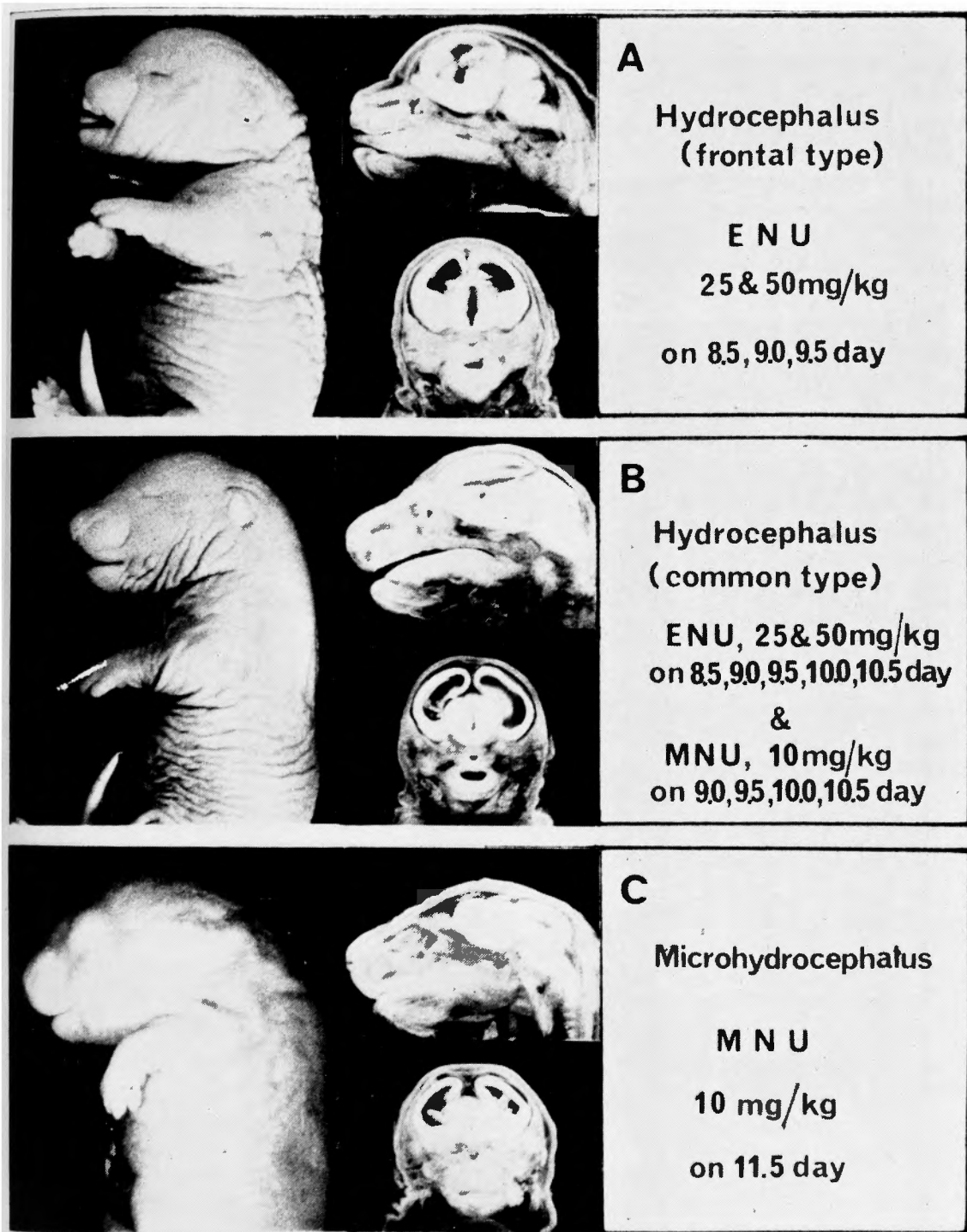


Fig. 6. CNS malformations in the offsprings treated with 10 mg/kg of MNU on day given at the bottom right of the pictures.

Table 3

Rat No.	Body Weight (mg)	Sex	Sign and Symptom		
			Ataxia Tremor +	Ataxia Tremor ++	Ataxia Tremor +++
1	275	M	●		
2	215	M		●	
3	210	M	●		
4	210	M	●		
5	210	M		●	
6	185	M		●	
7	180	F		●	
8	170	F		●	
9	170	M		●	
10	160	F		●	
11	140	M			●
12	135	M		●	
13	90	F	●		
Total			4	8	1

Variation of body weight and grade of symptom of ataxic rats on day 120 of postnatal life.



**Fig. 8.** Various types of hydrocephalus in rat embryos treated with MNU or ENU on day given in each picture.

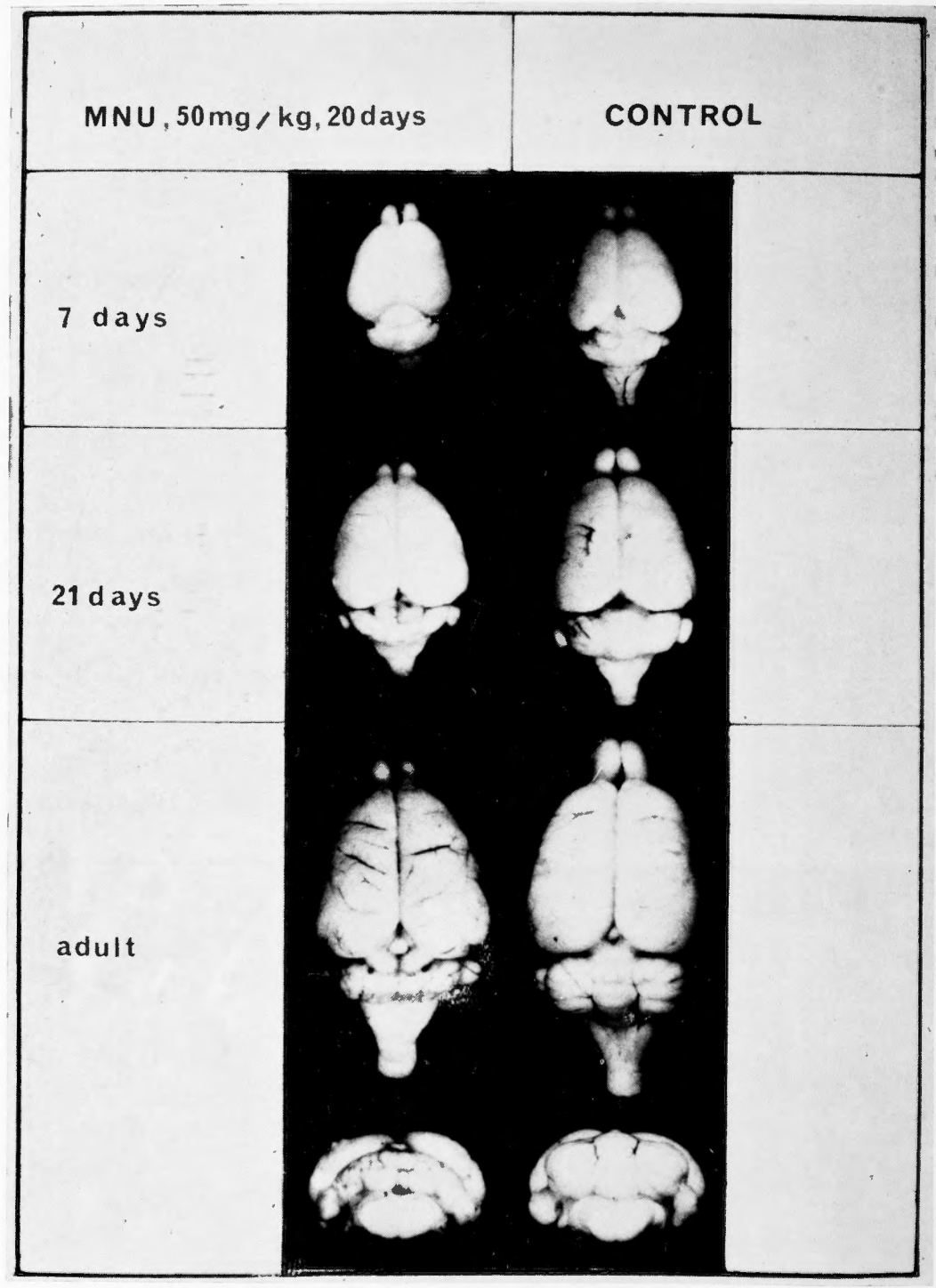


Fig. 9. Hypoplastic cerebellum in newborn and adult rats treated with 50mg/kg of MNU on day 20.5 of intrauterine life.

Table 4

	Day of Treatment							
	8.5	9.5	10.5	11.5	12.5	13.5	14.5	15.5
No. of mother rats used	5	6	7	5	5	5	5	6
Total implantations	66	78	87	59	64	57	54	74
Resorptions	65	27	19	3	0	0	1	1
Survivors	1	51	68	56	64	57	53	73
Ext. normal	0	30	68	56	64	10	53	73
Ext. abnormal	1	21*	0	0	0	47**	0	0
CNS malformation	1	46	3	0	0	0	0	0
Exencephaly Encephalocele	0	11	0	0	0	0	0	0
Hydrocephalus (Frontal type)	1 (1)	35 (2)	3 (0)	0	0	0	0	0
Others	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal	0	5	65	56	64	10	53	73

Toxic and teratogenic effects of 50mg/kg of ENU on rat embryos

\* Common type of hydrocephalus which seem to be externally normal are excluded

\*\* All of the embryos showed syndactyly and/or oligodactyly.

Table 5

	Day of Treatment				
	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
No. of mother rats used	5	5	8	6	6
Total implantations	60	58	93	73	73
Resorptions	19	11	23	14	12
Survivours	41	47	70	59	61
Ext. normal	41	47	38	51	61
Ext. abnormal	0	0	32	8	0
CNS malformation	0	4	57	52	6
Exencephaly	0	0	6	2	0
Encephalocele	0	0	8	2	0
Hydrocephalus (Frontal type)	0	4 (0)	42 (10)	46 (2)	6 (0)
Others	0	0	1	2	0
Normal	41	43	12	7	55

Toxic and teratogenic effects of 25mg/kg of ENU on rat embryos

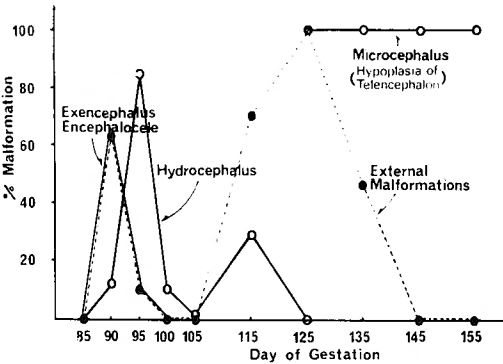


Fig. 7. Taratogenic action of 10mg/kg of MNU on SD-JCL rat embryos.

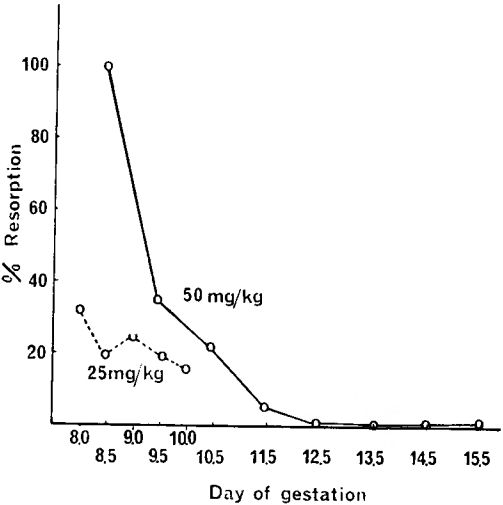


Fig. 10. Lethal effects of 25, 50 mg/kg of ENU on SD-JCL rat embryos.

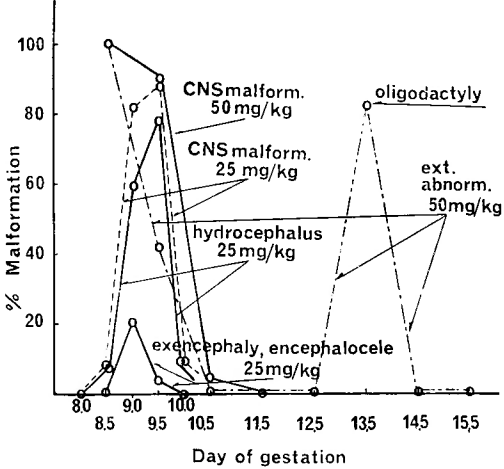


Fig. 11. Teratogenic action of 25, 50mg/kg of ENU on SD-JCL rat embryos.

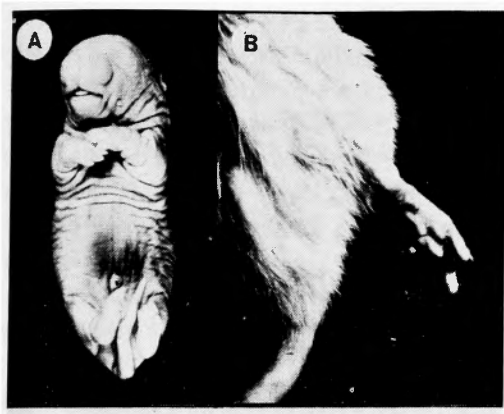
場合には、分娩、哺乳、発育には支障を認めず、趾指に奇形がみられる13.5日投与群でさえ suffocation を全く受けなかった。13.5日投与の胎児で観察し得た指趾の奇形は前述のように 82.6%であったが、生後観察ではさらに小さな指の奇形も認めえたので、奇形発現率はさらに増加し95%以上となった。

なおこのように指趾にみられる奇形は ENU が確かに胎児に作用をしたことの early detection を可能とするので発癌作用をみるため長期飼育する場合には非常に有効な目標となる。

Table 6

Treatment	No. of Hydrocephalus		No. of Hydrocephalus	
	No. of Total Implantations		No. of Survivours	
ENU 25mg/kg, day 9.0	42/93	45.2%	42/70	60.0%
ENU 25mg/kg, day 9.5	46/73	63.0%	46/59	78.0%
ENU 50mg/kg, day 9.5	35/78	44.9%	35/51	68.6%
MNU 10mg/kg, day 9.0	2/59	3.4%	2/16	12.5%
MNU 10mg/kg, day 9.5	17/72	23.6%	17/20	85.0%

Percentage of hydrocephalus in rat embryos treated with various doses of MNU or ENU on days 9.0 and 9.5 of gestation.



Oligodactyly, ENU, on 13.5 day

A: embryo

B: adult

Fig. 12. Oligodactyly in the rat embryo and adult rat treated with 50 mg/kg of ENU on day 13.5 of gestation.

#### Ⅳ 考 按

Dimethyl-nitrosamine が rat に対し発癌性をもつことを Magee と Barnes<sup>44)</sup> が発見して以来、この物質またはこれに類似の化学物質に関する実験的研究は多数みられ<sup>28, 46, 60)</sup>、ことに Drukrey らは、約90種の dialkyl-nitrosamine, acyl-alkyl-nitrosamide を系統的に検索した結果、65種の N-nitroso-compound に化学組成と発癌作用が起るいわゆる“target organ”との間に相関がみられることを明らかにした<sup>8, 11, 13, 15, 16, 17, 28, 60)</sup>。

これらの N-nitroso-compound のなかで、N-methyl-nitroso-urea (MNU) は一時に大量を静脈内に注射したときは、種々の臓器に腫瘍が発生するが<sup>10)</sup>、小量をくりかえし静脈内にあたえたと脳又は脊髄に極めて高率に腫瘍の発生がみられ<sup>12)</sup>、さらに経口投与でも<sup>61)</sup>、腹腔内投与でも<sup>63)</sup>ほぼ同様の結果が得られることが明らかにされ、脳腫瘍の実験的研究に一つの新しい方法が導入されたのである。

その他 trimethyl-nitroso-urea<sup>31)</sup>でも神経系に腫瘍を発生させること、ethyl-nitroso-urea では妊娠時に投与するとその offspring の神経系に腫瘍がみられること<sup>14, 32)</sup>などがつきつぎと証明され、神経組織に対し organotropy を示すためには下記の構造式

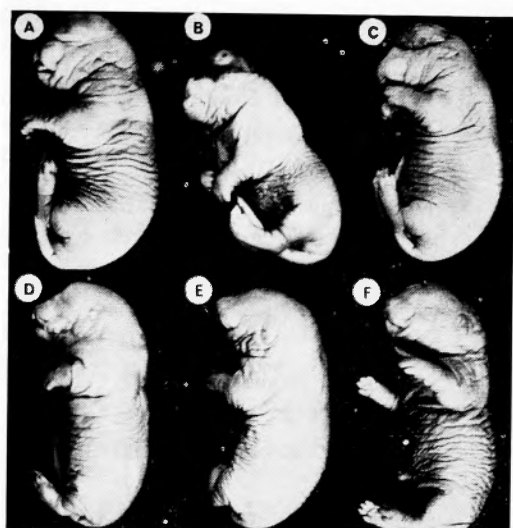
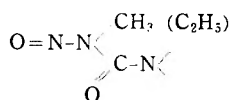


Fig. 13. Various patterns of exencephaly and encephalocele in rat embryos treated with MNU or ENU on day 9.0 of gestation.

をもつ N-nitroso-compound が必須の条件であると推定されるに至った。



発癌物質の胎盤を通過して、その offspring に腫瘍を発生させるという問題は Druckrey と Steinhoff (1962)<sup>9)</sup> が diethylnitrosoamine DENA を妊娠時の guinea pig に投与すると adult guinea pig に投与した場合よりもむしろ短い“latency period”で腫瘍が発生すると報告したことに始る。又 ethyl-nitroso-urea (ENU) では rat で生後160日令ですでに脳腫瘍が発見されている<sup>11)</sup> Thomas と Bollmann<sup>62)</sup> はこの経胎盤性発癌作用に注目し、DENA を妊娠 rat にあたえ母 rat および offspring にみられた腫瘍の発生部位、性状、“latency period”を検討した。DENA は種々の実験動物に経口、注腸、あるいは静脈内投与のいずれにおいても、肝腫瘍が大部分の個体に発生することが知られているが、これに反し offspring にみられた腫瘍の部位は鼻腔、乳房、胸腺、甲状腺、卵巣、肝、膀胱、脊髄、陰、脾等全く organotropy を示すことがなかったのである。

Jobst (1967)<sup>35)</sup> も少量の MNU をくりかえし妊娠



rat に投与し、その offspring に腫瘍を作りえたが、気管支、甲状腺、乳房の腫瘍のみであり adult rat の場合のように神経系に対する *orgnotropy* は認めていない。しかし終脳の発育は阻害され、小頭症であったと報告している。

一方 Kreybig (1965)<sup>41, 42)</sup> は妊娠13日目、14日目の rat に 10mg/kg 又は 20mg/kg の MNU を投与し胎児に極めて強い催奇形作用をみとめ、脳に対しては cyclophosphamide<sup>2, 40)</sup> と同様一次的に作用し奇形を起すものと推定した。

このように MNU は adult rat に対しては選択的に神経系に発癌作用を示すが、胎盤を経過したあとでは脳の奇形を起しうるにかかわらず脳腫瘍の発生はみないのである。

これに対し ENU は胎生15日目に投与すると四肢(指趾)の奇形はみられるが、脳には異常がみられず、反対に腫瘍に対しては中枢神経系が高い感受性をもっているのである。

前述のように MNU での催奇形作用の最も特徴的な所見は同じ時期に cyclophosphamide を投与したときには頭蓋骨ことに前頭、側頭および後頭骨の scleroblastema の分化を阻害し、外脳症を起すことがみられたのに反し、あくまでも終脳そのものの発育が阻害され、頭蓋骨の化骨はすすんでいるのかかわらず大脳半球の形態は胎生14~15日目の発育程度にとどまっていることであった。Jobst は妊娠時期をみずに少量の MNU をくりかえし投与したのであっておそらく彼が記載した小頭症は胎生15日目ごろに MNU が作用して終脳の発育が悪いものが分娩され生き残ったものと推定される。Napalkov と Alexandrov<sup>53)</sup> は妊娠第1日から第17日目までの間に MNU 10mg/kg を母 rat の腹腔内に一回のみ注射を行ないそれぞれの日に特有な外表奇形がみられることを認め、それを stage specific な作用であると報告した。又妊娠第3日、第9日目の投与では強い胎児致死効果がみられ、さらに水頭症、外脳症などの出現を報じた。

われわれのこの実験によって MNU は外表奇形を stage specific に出現させるだけでなく脳の奇形も投与時期に応じて、それぞれ特有の形を表わすことが明らかとなった。

一般に rat では妊娠5~11日、すなわち原始器官の形態が決定される時期には催奇形物質に対する感受性はことに高く、妊娠12~14日の原始器官がさらに分化する時期においては催奇形物質が投与され作用した

時点の発生の段階によりその作用は大きく左右されるが、妊娠15日目以後になると形態上直接みられる変化はなくなってしまうといわれている。しかし MNU においては、このいずれの時期においても脳の発育に対して強い阻害作用がみられた。すなわち妊娠8.5~10.0日投与では外脳症、脳脱、水頭症などが、さらに11.5日にも低率ではあるが形成障害を伴った水頭症がられた。12.5日には最も強い催奇形作用があり、それ以後もその程度は次第に減少はしてゆくものの明らかな終脳の発育阻害作用がつづき15日目でさえ小頭症が全例にみられた。

さらに分娩1日前にいたっても小脳の発育が強く阻害された。このように MNU は胎生期間の長期にわたり脳の奇形を作りうることは強調されてよい。

ENU の催奇形作用に関する記載は、Druckrey, Ivankovic および Preussmann によって妊娠15日目の BD 系 rat の静脈内に注射すると指趾の欠指、癒合指が認められたという報告が初めである<sup>14, 32)</sup>、しかしこの奇形をもった offspring には生後160日令以上で脳腫瘍が発見されたため、経胎盤性の発癌作用、ことに中枢神経系の腫瘍の発生の研究に関心が向けられ、催奇形作用の検討は行なわれていないようである<sup>18, 33, 66)</sup>。われわれの実験では、ENU の催奇形作用は、胎盤の形成期以前とあとに分けて考えるのがよいようで、前期では MNU でみられた奇形と類似したものであったが、後期では全く異り13.5日投与群に指趾の奇形を認めたのみであった。

MNU と ENU の SD-JCL rat に対する催奇形作用、致死作用の差異は Fig. 1, 2, 7, 10, 11 に示した。

MNU, ENU は共に化学的に非常に不安定な物質で、弱アルカリの水溶液では最もすみやかに分解され、酵素活性には影響を受けない。polarography による MNU と ENU の分解速度の比較研究<sup>24, 45)</sup> においては両者に差はみとめられず、pH 7, 37.5°C の biological fluid 中に溶解した場合にも共に半減期は約20分であり<sup>23)</sup>、in vitro では両者の安定性は同等であるといえる。rat の静脈内に注射したときの血中濃度を MNU について調べた実験<sup>56)</sup>では5分間で約75%、15分ではほぼ完全に消失する。

現在の知見では N-nitroso compound の発癌作用や急性細胞障害 (acute cell injury) 作用はこれら自体がもつだけでなく“active”な分解産物によるものであるといわれている。<sup>14</sup>C をラベルした N-nitroso compound を使った研究では核酸のアルキル化が証明

され、DNA ばかりでなく RNA においてもメチル化は主として7(N)にある guanine で起ることが証明されている<sup>45, 57)</sup>。

したがって MNU, ENU の催奇形作用が DNA 合成および DNA dependent RNA 合成系を阻害するだけでなく RNA 合成系にも影響するために妊娠10日以前ばかりでなく、胎盤形成期以後にも作用し奇形を作りうるものであると考えられる。

しかし胎盤形成期以後で MNU はさらに強い催奇形効果を脳に現わすが、ENU では認められなくなることはこれだけによって説明することは困難であり、DNA 合成の阻害作用について両者の差異が今後さらに研究される必要がある。

なお種子<sup>71)</sup>、放線菌<sup>26)</sup>、などで両者の mutagenic action を調べたものでは、MNU が ENU に比べ強力であることがわかっている。

MNU, ENU による脳の奇形については症候別にのべる。

#### (i) 小脳の奇形；

Jackson 研究所の ataxic mouse ( $ax^J/ax^J$ )<sup>65)</sup> は Kreisler stock より、“Wobbler”<sup>19)</sup> は C57BL/F の中から自然発生したもので、いずれも遺伝的な神経疾患であり遺伝性家族性失調の研究に有力な材料となっている。しかし実験動物に先天性の ataxia を作り得たという報告は極めて少なく、マンガン欠乏症の rat で otic labyrinth の奇形による ataxia がみられたこと<sup>30)</sup>、ビタミンA欠乏症の pig で水頭症のため二次的に小脳の発育が阻害され ataxia を起したと考えられた報告<sup>54)</sup>および hyperthermia により ataxia と uncoordinated movements をもつ guinea pig の子供が出来た<sup>20)</sup>などの記載が散見されるのみである。

われわれの実験では MNU を妊娠末期に母 rat に投与すると offspring の全例に小脳の形成不全があり、ataxia, tremor などを現わすことを見いだした。

rat の脳は出産後も hyperplasia, hypertrophy により急激に発達するが、ことに小脳の発育にはこの時期が重要であって、生後13日までは急激な細胞数の増加が、13日より17日には細胞数の増加に加え、細胞そのものの増大が起り、さらに17日以上においては細胞そのものの増大が起るとされている<sup>69)</sup>。

もしこの時期に DNA 合成が阻害されれば小脳の発育は遅延することは容易に考えられ、事実、哺乳条件

を悪くしただけでも脳の DNA や蛋白の含有量は低下し、ことに小脳においていちいちしいといわれている<sup>21)</sup>。しかし Kelly ら<sup>39)</sup>が newborn rat (SD-JCL rat と同系)に MNU をあたえ発癌作用を検討した実験では ataxia を認めたという記載はない。

したがって分娩直前で、しかも小脳の発育に最も重要な時期に MNU を作用させることが必要であると推定される。

このことは MNU の催奇形作用が一般に考えられている critical period 以上に長期にわたりつづくことを示すと同時に、この方法で ataxic rat が量産出来るので、小脳失調の研究に1つの新しい model となりうると考えられる。

#### (ii) 外脳症、脳脱

外脳症、脳脱が実験動物に作りうることは Gillman ら<sup>25)</sup>が trypan blue を妊娠 rat に投与したときすでに認めており rat にかぎっても、vinca alkaloid<sup>5, 49)</sup>、chlorambucil<sup>6, 50)</sup>、nitrogen mustard<sup>48)</sup>、purine and pyrimidine antimetabolite<sup>52)</sup>、hadacidin<sup>3)</sup>、cyclophosphamide<sup>27, 40, 51)</sup>など多数の報告がある。

村上<sup>49)</sup>によれば、外脳症は体節形成前期より頭部神経褶の閉鎖直前の発生段階で、あるいは神経管がいったん閉鎖したのちにある種の催奇形物質が作用して成立するものと考えられており、vincristine のように妊娠8日目投与で出現するもの、cyclophosphamide のように13日目投与でないと外脳症がみられないものがある。

MNU, ENU ではともに産栓のみられた日を妊娠0日として9.0~9.5にかぎられており、神経管閉鎖直前にのみ作用するものと考えられる。頻度は vinca alkaloid<sup>5)</sup>、chlorambucil<sup>50)</sup>などに比べけっして高いものでない。

#### (iii) 水頭症

水頭症は actinomycin D<sup>68)</sup>、cyclophosphamide<sup>27)</sup>、trypan blue<sup>59)</sup>、purine antimetabolite<sup>72)</sup>、salicylate<sup>64)</sup>、triparanol<sup>55)</sup> などの多くの薬剤で rat に起ることが知られており X線照射<sup>49)</sup>でもみられる。

われわれは MNU の妊娠9.5日、11.5日投与で水頭症が2峰性に出現することを認めたが、X線放射でもある種の mouse (ddN 系)では9日、11日放射で peak を示す。

一方、Brent<sup>1)</sup>が teratogenic antisera を8, 9, 10, 11日目の妊娠 rat に投与し、水頭症をそれぞれ40.9, 75.0, 47.8, 78.7%に認めた実験は興味がある。

頻度からみると purine antimetabolite<sup>72)</sup>が55%, trypan blue<sup>59)</sup>が10%程度の水頭症を起すといわれており, われわれの MNU 10mg/kg, 9.5日投与群の85%は極めて高率という。しかし死胚, 吸収胚が多くみられるため実際は ENU 25mg/kg, 9.5日投与の方が水頭症を作る場合効率がよく, 総着床数の60%以上, 総生存胎児の約75%が水頭症となる (Table 6)。X線照射や vincristine 投与の場合では, ヒトの水頭症によくみられるように髄液環流障害が主なる原因でなくいわゆる dysgenetic hydrocephalus の範疇に入るものであるといわれるが<sup>49)</sup>, salicylate<sup>64)</sup>や triparanol<sup>55)</sup>の場合には側脳室, Monro 孔, 第3脳室の拡大があり aqueduct の狭窄~閉鎖が認められている。

MNU 10mg/kg, 9.5日投与でみられたものは側脳室の拡大が主であり外套が薄くなっているか, aqueduct もその程度の差があっても狭窄がみられた。これに反して MNU 10mg/kg 11.5日投与では少数ではあるが, 第3脳室の拡大も同時にみられるにもかかわらず aqueduct は patent であった。しかし外套はさらに薄くいわゆる midline structure の形成が悪く, 両大脳半球間に離開が著明であることは dysgenetic hydrocephalus に入れるべきものと考えられる。ENU 50mg/kg, 又は 25mg/kg 9.0, 9.5, 10.0日投与の水頭症は, MNU 9.5日投与のものと形態上大差はないが, より程度の強いものがみられ, Monro 孔, 第3脳室にも拡大がおよんでいるものがあり aqueduct の閉鎖したものもみられる。さらに ENU 25mg/kg, 9.0日投与の水頭症42例中10例などにみられるように側脳室の前角先端がきわだって大きく, 外表からでも前額部が突出していることから容易にこの type であると判定出来るものがある。これをわれわれは仮に「frontal type hydrocephalus」として他の一般的な hydrocephalus と区別した (Fig. 8, A, B) が, 単に程度の差であるのかあるいは全く異なった成立機序によるのかは現在はまだ不明である。このような形態をとる水頭症の記載は古く Colton (1929)<sup>4)</sup>の報告にみられる。Wister 系 rat の newborn の中で4匹をみつけたのであるが, 当時はまだ哺乳動物に対し催奇形作用のある薬剤は知られていなかったもので, 恐らく自然発生と考えられるが, 彼の記載によると頭蓋, 前頭部が半球状をなし顔の側面像は正常にくらべ凹面であるという。

このように MNU 又は ENU を SD-JCL rat の

種々の妊娠日に投与すると, 多少の移行型はあるにしても大別して3種の水頭症が得られる。ヒトの水頭症の形態は千差万別であり, これのみで説明されるものでないが, 実験 model の1つとしての意義はあるものと思われる。

#### iv) 小頭症

小頭症は主にX線照射により成立する。しかし vincristine sulfate<sup>49)</sup>でも妊娠9日目の投与で約27%に作成されており<sup>5)</sup>, cyclophosphamide では10日目, 12日目投与で起っている<sup>27)</sup>。その他ビタミンA過剰でも小頭症が成立するといわれている<sup>49)</sup>。

MNUで小頭症が生じることはすでに Jobst<sup>35)</sup>が報告しているが, われわれのように一回投与でなかったために stage specific な変化には気付いていない。今回の実験結果と対比して興味深いのは myleran を使った亀山ら<sup>37)</sup>の報告である。すなわち妊娠12日より14日まで連続して 20mg/kg/day を投与した場合にかぎり小頭症は100%に成立するが, 40mg/kg を12, 13, および14日目の各日にそれぞれ一回投与を行なった場合にはその頻度は23~43%と低くなったという。

これに対し MNU 10mg/kg は妊娠12, 13, 14, および15日目のいずれの日にも単一注射をしても小頭症は100%成立し, しかも投与した日によく一致した形態を示した (Fig. 4)。いずれも Kreybig<sup>41)</sup>がいうように destructive な変化によるものである。

ENU 50mg/kg 以下での単一注射では SD-JCL rat に対して少くとも妊娠10.5日以後の投与では小頭症を起さないようである。

以上, 脳の奇形のみについて考察したが, 目, 口唇, 外耳, 軀幹, 四肢などにも多彩な奇形がみられる。

われわれが得た現在までの知見は, 主として形態上の変化であって, 生化学的, 組織化学的, 生理的变化などについては今後の問題である。MNU による種々の酵素活性の変化に関する研究は最近 Johnson と Lambert<sup>36)</sup>により始められたばかりである。

先に述べたように MNU は SD-JCL rat の脳の発生に極めて強い変化を種々の妊娠時期に現わし, ENU は胎盤形成期以後には形態上の変化は現わさないものの, その offspring に高率に脳腫瘍が発生して来る<sup>47)</sup>。したがって MNU, ENU などの alkyl-nitrosourea は将来脳の奇形, 脳の腫瘍の発生病理を解明していく上に重要な役割をはたしていくものと思われ, まず催奇形作用について実験したのであるが,

今後は脳の奇形と脳腫瘍の相関を明らかにする他に、多方面にわたる詳細な研究が必要であると考ええる。

## V 結 語

MNU は rat の中枢神経系に対する発癌作用と同時に胎児の脳にも一次的な发育障害作用をもっている。又 ENU は経胎盤性に神経系腫瘍を発生させる、これらの作用に注目して、われわれは MNU, ENU の SD-JCL rat の脳に対する発癌作用、催奇形作用の相関を検討しているが、ここでは両者の催奇形作用について比較検討した。

1) MNU 10mg/kg を妊娠8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.5, 12.5, 13.5, 14.5, および 15.5に一回腹腔内注射を行うと、脳の奇形は全ての時期にわたって stage specific に出現する。即ち8.5投与では外套の形成不全がみられ、9.0日投与では外脳症、脳髄膜瘤が62.5%に、9.5日投与では生存胎児の85.0%に水頭症がみられた。10.0日投与では一時催奇形作用はほとんどみられなくなるが、11.5日投与では小水頭症が29.3%に出現した。12.5日投与では終脳の发育は極めて強く阻害され特異な小頭症となった。この作用は漸減していくものの15.5日投与でもみられ、胎盤形成以後は全例小水頭症、または小頭症となり MNU の終脳に対する发育障害作用の強いことが証明された。

2) MNU 50mg/kg を妊娠末期の20.5日に投与した場合、小脳に发育障害作用がみられた。この処置を受けた offspring は乳幼時期の死亡率が高く、生き残ったものにはほとんど全例に ataxia, generalized fine tremor などがみられた。小脳は hypo-dysplastic であった。

3) ENU 25mg/kg 又は 50mg/kg を MNU と同様の方法で投与した。8.5日より10.5日間の投与による脳に対する催奇形作用は MNU によく似ており、外脳症、脳髄膜瘤は9.0日投与で、水頭症は9.5日投与で最も多く出現した。しかし、胎盤形成期以後は脳に対して催奇形作用を示さず、小頭症は認められなかった。特異な所見として13.5日投与のものにかぎり、癒合指、欠指が82.6%にみられた。

4) 水頭症の実験 model として MNU, ENU を用いる場合 SD-JCL rat では ENU 25mg/kg, 9.5日投与が最もよいようであり、全着床数の63.0%, 生存胎児の78.0%が水頭症となった。

5) MNU, ENU の offspring に対する出産後の影響をみると MNU ではあまりにも強い外表奇形の

ためか分娩直後に suffocation されるのに対し、ENU 投与のものは10.5日以後の投与ではほとんど全例問題なく飼育することが可能で、経胎盤性発癌作用の実験には非常に都合のよいことがわかった。

以上のように、MNU, ENU 投与による動物実験は脳神経外科領域における2大疾患群の原因究明の実験 model として有用なものと思われる。

終りに臨み、終始懇初なる御指導および御校閲を賜った半田肇教授、絶えず御指導ならびに叱咤、激励を頂いた半田護二講師に深甚の謝意を表します。また発癌作用の相関について御指導、御助言を賜った北野病院脳神経外科部長、松本悟博士に心から感謝致します。

## 文 献

- 1) Brent, A.: The production of congenital malformations using tissue antisera. II The spectrum and incidence of malformations following the administration of kidney antiserum to pregnant rats. *Am. J. Anat.*, **115**: 525-41, 1964.
- 2) Brock, N. und Kreybig, T.: Experimenteller Beitrag zur Prüfung teratogener Wirkungen von Arzneimitteln an der Laboratoriumsratte. *Naunyn Schmiedeb. Arch. Exp. Path.*, **249**: 117-45, 1964.
- 3) Chaube, S. and Murphy, M. L.: Teratogenic effect of hadacin (a new growth inhibitory chemical) on the rat fetus. *J. Exp. Zool.*, **152**: 67-73, 1963.
- 4) Colton, H. S.: "High brow" albino rats. *J. Hered.*, **20**: 225-27, 1929.
- 5) DeMeyer, W.: Production of major cerebral malformations by drugs with special reference to the holoprosencephalies (cyclopia-arhiencephaly). *Proc. Int. Cong. Neuropathol.* **5**: 717-21, 1965.
- 6) Didcock, K. A., Jackson, D. and Robson, J. M.: The action of some nucleotoxic substances on pregnancy. *Brit. J. Pharmacol.*, **11**: 437-41, 1965.
- 7) Dipaolo, A. J. and Kotin, P.: Teratogenesis-oncogenesis: A study of possible relationships. *Arch. Pathol.*, **81**: 3-23, 1966.
- 8) Druckrey, H., Preussmann, R., Afkhan, J. und Blum, G.: Erzeugung von Lungenkrebs durch Methylnitrosourethan bei intravenöser Gabe an Ratten. *Naturwissen-*

- chaften, 49 : 451, 1962.
- 9) Druckrey, H. und Steinhoff, D. : Erzeugung von Leberkrebs an Meerschweichen. *Naturwissenschaften*, 49 : 497-98, 1962.
  - 10) Druckrey, H., Steinhoff, D., Preussmann, R. und Ivankovic, S. : Erzeugung von Krebs durch eine einmalige Dosis von Methylnitroso-Harnstoff und verschiedenen Dialkylnitrosaminen an Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 66 : 1-10, 1964.
  - 11) Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmidt, C. H., Mennel, H. D. und Stahl, K. W. : Selektive Erzeugung von Blasenkrebs an Ratten durch Dibutyl- und N-Butyl-N-butanol-(4)-nitrosamin. *Z. Krebsforsch.*, 66 : 280-290, 1964.
  - 12) Druckrey, H., Ivankovic, S. und Preussmann, R. : Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-N-nitrosoharnstoff. *Z. Krebsforsch.*, 66 : 389-408, 1965.
  - 13) Druckrey, H., Ivankovic, S. und So, B. T. : Erzeugung von Carcinomen der Haut bei Ratten durch intravenöse Injektion von Diazoessigerster. *Z. Krebsforsch.*, 66 : 523-25, 1965.
  - 14) Druckrey, H., Ivankovic, S. und Preussmann, R. : Teratogenic and carcinogenic effects in the offsprings after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. *Nature*, 210 : 1378-9, 1966.
  - 15) Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. und Müller, M. : Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 69 : 103-201, 1967.
  - 16) Druckrey, H., Landschütz, Ch. und Preussmann, R. : Oesophagus-Carcinoma nach Inhalation von Methyl-buthyl-nitrosamin (MBNA) an Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 71 : 135-39, 1968.
  - 17) Druckrey, H. : Erzeugung von Magen- und -Pankreas-Krebs beim Meerschweichen durch Metyl-Nitroso-Harnstoff und Urethan. *Z. Krebsforsch.*, 71 : 167-82, 1968.
  - 18) Druckrey, H., Landschütz, Ch. und Ivankovic, S. : Transplacentare Erzeugung maligner Tumoren des Nervensystems II. Äthyl-nitrosoharnstoff an 10 genetisch definierten Rattenstämmen. *Z. Krebsforsch.*, 73 : 371-86, 1970.
  - 19) Duchon, L. W. and Strich, S. J. : An hereditary motor neurone disease with progressive denervation of muscle in the mouse the mutant 'Wobber'. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 31 : 535-42, 1968.
  - 20) Edward, M. J. : Congenital defects in gunia pigs following hyperthermia during gestation. *Arch. Path.*, 84 : 42-8, 1967.
  - 21) Fish, I. and Winick, M. : Effect of malnutrition on regional growth of the developing rat brain. *Exp. Neurol.*, 25 : 534-40, 1969.
  - 22) 福井仁士 : 実験的脳腫瘍に関する研究, 医学研究. 40 : 117-38, 1970.
  - 23) Garrett, E. R., Goto, S. and Stubbins, J. F. : Kinetics of solvolyses of virious N-alkyl-N-nitrosoureas in neutral and alkaline solutions. *J. Phrm. Sci.*, 54 : 119-23, 1965.
  - 24) Garrett, E. D. and Cusimoto, A. G. : Polarography of various N-alkyl-N-nitrosoureas. *J. Pharm. Sci.*, 55 : 702-10, 1966.
  - 25) Gillman, J., Gilbert, C., Gillman, T. and Spence, I. : A preliminary report on hydrocephalus, spina bifida and other congenital anomalies in the rat produced by trypan blue. *S. Afr. J. med. Sci.*, 13 : 47-90, 1948.
  - 26) Gumanov, L. L. and Norenko, N. P. : Metagenic action of nitrosoalkylurea on actinomycetes. *Genetika*, 82-8, 1966. (Russ) (after english sammary)
  - 27) Hackenberger, I. und Krybig, T. : Vergleichende teratologische Untersuchungen bei der Maus und der Ratte. *Arzneimittelforschung*, 15 : 1456-60, 1965.
  - 28) Herrold, K. M. : Induction of olfactory neuroepithelial tumors in syrian hamster by diethylnitrosamine. *Cancer*, 17 : 114-21, 1964.
  - 29) Hopewell, J. W. and Wright, E. A. : The importance of implantation site in cerebral carcinogenesis in rats. *Cancer Res.*, 29 : 1927-31, 1969.
  - 30) Hurley, L. S., Wooten, E., Everson, G. J. and Asling, C. W. : Anomalous development of ossification in the inner ear of manganese-deficient rats. *J. Nutr.*, 71 : 15-19, 1960.
  - 31) Ivankovic, S., Druckrey, H. und Preussmann, R. : Erzeugung von Tumoren im peripheren und zentralen Nervensystem durch Trimethyl-nitroso-harnstoff an Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 66 : 541-48, 1965.
  - 32) Ivankovic, S., Druckrey, H., Preussmann, R. : Erzeugung neurogener Tumoren bei den Nachkommen nach einmaliger Injektion von Äthylnitrosoharnstoff an sch-

- wangere Ratten. *Naturwissenschaften*, 53 : 410, 1966.
- 33) Ivankovic, S. und Druckrey, H. : Transplacentare Erzeugung Tumoren des Nervensystems I. Äthyl-nitroso-harnstoff (ÄNH) an BD IX-Ratten. *Z. Krebsforsch.*, 71 : 320-60, 1968.
  - 34) Jänisch, W. : Die Induction von experimentellen Hirngeschwülsten mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen. *Z. Krebsforsch.*, 68 : 224-33, 1966.
  - 35) Jobst, K. : Teratogenous changes and tumors in rats following treatment with methylnitroso-urea (MNU). *Neoplasma*, 14 : 435-436, 1967.
  - 36) Johnson E. M., Lambert, C. . Effects of N-nitroso-N-methyl-urea on enzymatic ontogeny associated with teratogenesis. *Teratology*, 1 : 179-92, 1968.
  - 37) 亀山義郎, 黒宮詔子, 佐々木博, 菅原勉, 棚瀬久雄, 山本肇, 村上氏広 : Myleran のラット胎仔におよぼす影響 (I). *環研年報* X VII, 194 ~199, 1966
  - 38) Koyama, T., Handa, J., Handa, H. and Matsumoto, S. : Methylnitroso-urea-induced malformations of the brain in SD-JCL rat. *Arch. Neurol.*, 22 : 342-47, 1970.
  - 39) Kelly, M. G., Ogara, R. W., Yancey, S. T. and Botkin, C. : Carcinogenicity of 1-methyl-1-nitroso-urea in newborn mice and rats. *J. Nat. Cancer Inst.*, 41 : 619-26, 1968.
  - 40) Kreybig, T. : Die teratogene Wirkung von Cyclophosphamid während der embryonalen Entwicklungsphase bei der Ratte. *Naunyn Schmiedeberg Arch. exp. Path.*, 252 : 173-95, 1965.
  - 41) Kreybig, T. : Die Wirkung einer carcinogenen Methylnitroso-Harnstoff-Dosis auf die Embryonalentwicklung der Ratte. *Z. Krebsforsch.*, 67 : 46-50, 1965.
  - 42) Kreybig, T. und Schmidt, W. : Zur chemischen Teratogenese bei der Ratte. *Arzneimittelforsch.*, 16 : (8), 889-1001, 1966.
  - 43) Larsell, O. : The morphogenesis and adult pattern of the lobes and fissures of the cerebellum of the white rat. *J. comparative Neurol.*, 97 : 281-356, 1952.
  - 44) Magee, P. N. and Barnes, J. M. : The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Brit. J. Cancer*, 10 : 114-22, 1956.
  - 45) Magee, P. N. and Farber, E. : Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.*, 83 : 114-24, 1962.
  - 46) Magee, P. N. and Barnes, J. M. : Carcinogenic nitroso compounds. *Advan. Cancer Res.*, 10 : 163-246, 1967.
  - 47) 松本 悟, 小山素麿, 半田譲二, 半田 肇 : ENU を胎盤経由で投与した SD-JCL rat の神経系実験腫瘍. 第11回日本神経病理学会昭和45年4月9,10日 (岡山)
  - 48) Müller, M. Does nitrogen mustard affects the fetus directly or secondarily by its effects on the mother? *Experimentia*, 22 : 247, 1966.
  - 49) 村上氏広 : 胎生期におよぶ外因と脳の形成障害. *先天異常* 7 : 1-13, 1967.
  - 50) Murphy, M. L., Moro, A. D. and Lacon, C. : Comparative effects of fine polyfunctional alkylating agents on the rat fetus, with additional notes on the chick embryos. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 68 : 762-81, 1958
  - 51) Murphy, M. L. : Teratogenic effects in the rat of growth inhibiting chemicals infibiting studies on thalidomide. *Clin. Proc. Child. Hosp. (Washington, D. C.)*, 18 : 307-22, 1962.
  - 52) Murphy, M. L. : Dose-response relationships in growth-inhibiting drugs in the rat : Time of treatment as a teratological determinant. In *Teratology, Principles and technique*, ed. Wilson, J. G. and Warkany, J. pp. 161-84, Chicago : Univ. of Chicago Press, 1964.
  - 53) Napalkov, N. P. Alexandorov, V. A. : On the effects of blastomogenic substances on the organism during embryogenesis. *Z. Krebsforsch.*, 71 : 32-50, 1968.
  - 54) Palludan, B. : The teratogenic effect of vitamin A deficiency in pigs. *Acta Vet. Scand.*, 2 : 32-59, 1961.
  - 55) Roux, C. Action tératogène du triparanol chez l' animal. *Arch. Fr. Pédiat.* 21 : 451-64, 1964.
  - 56) Swann, P. F. : The rate of breakdown of methyl methanesulphonate, dimethylsulphate and N-methyl-N-nitroso-urea in the rat. *Biochem. J.*, 110 : 49-52, 1968.
  - 57) Swann, P.F. and Magee, P.N. : Nitrosamine-induced carcinogenesis, The alkylation of nucleic acid of the rat by N-methyl-N-nitroso-urea, dimethylnitrosamine, dimethyl sulfate and methyl methanesulphonate.

- Biochem. J., 110 : 39-47, 1968.
- 58) Sweet, W. H. and Bailey, P. : Experimental production of intracranial tumors in the white rat. Arch. Neurol. Psychiat., 1047-49, 1941.
  - 59) Stempak, J. G. : Etiology of trypan blue induced antenatal hydrocephalus in the albino rat. Anat. Rec., 148 : 561-71, 1964.
  - 60) Takayama, S. : The histological and autoradiographical studies of mouse liver during the course of carcinogenesis by dimethyl-nitrosamine. Z. Krebsforsch., 71 : 246-54, 1968.
  - 61) Thomas, C. und Sierra, J.L. : Hirntumoren bei Ratten nach oraler Gabe von N-Nitroso-N-methyl-harnstoff. Naturwissenschaften, 54 : 228, 1967.
  - 62) Thomas, C. und Bollmann, R. : Untersuchungen zur diaplacentaren Krebserzeugenden Wirkung des Diäthylnitrosamines an Ratten. Z. Krebsforsch., 71 : 129-34, 1968.
  - 63) Thomas, C. und Sierra, J. L. : Neurogene Tumoren bei Ratten nach intraperitonealer Applikation von N-Nitroso-N-methyl-harnstoff. Naturwissenschaften, 55 : 183, 1968.
  - 64) Warkany, J. and Takeacs, E. : Experimental production of congenital malformations in rats by salicylate poisoning. Am. J. Path., 35 : 315-31, 1959.
  - 65) Weber, M. B. : A study of brain lipids, nucleic acid proteins in the ataxic (ax<sup>j</sup>) mouse. Neurology, 18 : 243-49, 1968.
  - 66) Wechsler, W., Kleihues, P., Matsumoto, S., Zülch, K.J., Ivankovic, S., Preussmann, R. and Druckrey, H. : Pathology of experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life. Ann. New York Acad. Sci., 159 : (2), 360-408, 1969.
  - 67) Wilson, J. : Teratology, Principles and Technique. pp. 262-77, Chicago : Univ. of Chicago Press, 1964.
  - 68) Wilson, J., Embryological considerations in teratology. Ann. N. Y. Acad. Sci., 123 : 219-27, 1965.
  - 69) Winick, M. and Noble, A. : Quantitative changes in DNA, RNA, and protein during prenatal and postnatal growth in the rat. Dev. Biol., 12 : 451-66, 1965.
  - 70) Zimmerman, H. M. and Arnord, H. : Experimental Brain Tumors. I. Tumors produced by methylcholanthren. Cancer Res., 1 : 919-1001, 1941.
  - 71) Zos, N.N. and Makarova, S.I. : Cytological analysis of the mutagenic action of nitrosoethylurea and nitrosomethylurea. Tsitologiya, 7 (3), 405-8, 1965 (Russ). (after english summary).
  - 72) Zunin, C. and Borroni, C. : L'effetto teratogeno della 6-mercaptopurina. Minerva Pediat. 7 : 66-71, 1955. (after Kalter, H., Teratology of the central nervous system. pp. 142, Univ. Chicago Press, 1968.)